

Title	Effect of X protein on Transactivation of Hepatitis B virus Promoters and on Viral Replication
Author(s)	中武, 博
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39555
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について /a> をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	中 武 博
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 0 5 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 7 月 1 7 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Effect of X protein on Transactivation of Hepatitis B virus Promoters and on Viral Replication (B型肝炎ウイルスプロモーターの活性化とウイルス複製におけるX蛋白の効果)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松原 謙一 (副査) 教 授 島田 和典 教 授 田中亀代次

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

B型肝炎ウイルス (HBV) は、不完全2本鎖からなるDNAウイルスで主に4種類の蛋白 (表面抗原, 核抗原, ポリメラーゼ, X蛋白) をコードしている。これらの蛋白は4つのプロモーター (SP1P, SP2P, CP, XP) により発現が制御されている。今回, X蛋白の各プロモーターに対する活性の違いやHBVゲノム配列のX蛋白の活性における関与及びウイルスの複製に対する影響を調べた。

【方法ならびに成績】

1) 変異X遺伝子のトランス活性化

X遺伝子のトランス活性化を調べる際の陰性対象として変異したX遺伝子が用いられる。その変異の影響を調べるために, HBVゲノムのX遺伝子の8, 118, 130, 番目のアミノ酸部位をそれぞれ終止コドンに変異させた。また, X遺伝子ORF内の3つのATGをそれぞれ終止コドンに変異させたX遺伝子発現プラスミドを構築した。それらのプラスミドをCプロモーターの下流にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を結合させたプラスミドとHepG2細胞に共に導入させ, そのCAT活性を測定した。その結果, 内在するATGからのX蛋白がトランス活性化能を保持している事が示された。よって, 陰性対象としてORF内のすべてのATGを終止コドンに変異させたプラスミド (pRSVXml) を用いる事とした。

2) HBVプロモーターに対する。X蛋白のトランス活性化能

HBVゲノム上の4つのプロモーターの下流にCAT遺伝子を挿入した。また, そのプロモーターとCAT遺伝子を単離したプラスミドを構築した。これらのCAT遺伝子を含むプラスミドをレポーターとした。また, X遺伝子を発現させるプラスミド (pRSVX) を構築した。pRSVXもしくはpRSVXmlと各レポーターを肝癌細胞株であるHepG2に共に導入させた。その細胞のCAT活性を測定し, pRSVXmlに対するpRSVXのCAT活性の比を求めた。その結果, プロモーターの単離に関わりなく2-3倍の値が得られた。

3) HBV複製におけるmRNAとHBV関連抗原産生に対するX蛋白の影響

X遺伝子の8, 118, 130番目のアミノ酸部位をそれぞれ終止コドンに変異させた2個のHBVゲノムを縦列させ、ウイルスを複製できるプラスミド(M1, M2, M3)を構築した。コントロールとして変異のないプラスミド(W)も構築した。これらのプラスミドをHepG2に導入しその培養上清の表面抗原(HBs)と核抗原(HBe)を測定した結果、M2とM3の抗原はWに比べて低い値を示したがM1はWと同等の値を示した。M2もしくはM3をpRSVXと共に導入すると、その抗原量はWのレベルに回復した。WとM2のHBV mRNAの量を比較するとM2のmRNAの量はWに対して、全ての分子種で数分の一に低下していた。

【総括】

X蛋白はその遺伝子の変異実験によりC末端領域にトランス活性化能が担われていることが示唆された。X蛋白はすべてのHBVプロモーターを活性化する能力を有しており、その程度はプロモーターの単離と無関係であった。よって、X蛋白の作用点は各々のプロモーター近傍にあると推測される。X蛋白はHBVの複製には不可欠ではないが、その複製を増強させる効果を有していた。よって、X蛋白はHBVの複製に正の制御をおこなっていると推測された。

論文審査の結果の要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)にコードされているX蛋白はプロモーター活性化能を有している事が示されているが、HBVの複製におけるX蛋白の役割は未だ不明確である。今回、そのHBVの複製におけるX蛋白の役割をプロモーター活性化という観点から研究を行った。X蛋白の発現プラスミドとHBVの各々のプロモーターの活性を測定するレポータープラスミドを肝癌細胞株に導入し、X蛋白のトランス活性化能を調べると、数倍に活性化しているのが確認できた。また、X遺伝子に変異を導入した複製可能なHBV DNAの培養細胞におけるウイルス産生量は、ワイルドタイプのHBVに比べて数分の一に減少した。これらのデータよりX蛋白はHBVの複製に正の制御をしている事が示された。以上の論文内容は学位の授与に値すると考えられる。